

日粮镁调控肉仔鸡肝脏过氧化氢酶活性途径的初步研究

刘永祥^{1,2}, 刘艳丽¹, 黄炎坤¹, 刘太宇¹, 吕于明²

(1 郑州牧业工程高等专科学校 畜牧工程系, 河南 郑州 450008; 2 中国农业大学 动物科技学院, 北京 100098)

[摘要] **【目的】**初步探讨了日粮镁调控肉仔鸡肝脏中过氧化氢酶(catalase, CAT)活性的途径。**【方法】**将 128 只 AA 肉仔鸡随机均分到对照组和加镁日粮组, 对照组日粮为普通玉米—豆粕日粮, 在此基础上每 kg 日粮添加 10 g 天门冬氨酸镁(MgAsp)作为加镁日粮组, 研究日粮镁对肉仔鸡肝脏 CAT 活性的影响。**【结果】**与对照组相比, 加镁日粮组肉仔鸡肝细胞中总镁和肝细胞内游离态镁浓度分别提高了 23.8% ($P<0.01$) 和 19.4% ($P<0.01$); 肝脏 CAT 活性及其 mRNA 水平分别提高了 14.3% 和 21.4% ($P<0.01$); 肝细胞总镁、肝细胞内游离态镁与 CAT 活性、CAT 基因 mRNA 丰度间均存在显著正相关 ($P<0.05$)。**【结论】**日粮中添加镁提高了肉仔鸡肝细胞内游离态镁浓度, 增强了 CAT 基因表达, 从而提高了 CAT 活性。

[关键词] 镁; 游离态镁; 过氧化氢酶; 基因表达; 肉仔鸡

[中图分类号] S816.72

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)09-0040-05

A pilot study on the pathways of dietary magnesium modulates on catalase activity in the liver of broiler chickens

LIU Yong-xiang^{1,2}, LIU Yan-li¹, HUANG Yan-kun¹, LIU Tai-yu¹, GUO Yu-ming²

(1 Animal Science Department, Zhengzhou Animal Husbandry College, Zhengzhou, Henan 450008, China;

2 College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: **【Objective】** The object of the present work was to investigate the pathways of dietary magnesium modulates catalase (CAT) activity in the liver of broiler chickens. **【Method】** One hundred twenty eight male Abor Acre broiler chickens were randomly allocated into two groups. Maize and soybean meals were the main ingredients of the control diet, and the control diet supplemented with 10 g/kg MgAsp served as the Mg supplementation diet. **【Result】** Compared with the control, hepatic total Mg and ionized Mg concentrations in hepatocytes increased by 23.8% and 19.4% respectively ($P<0.01$), while the hepatic CAT activity and its gene mRNA level increased by 14.3% and 21.4% respectively ($P<0.01$). Positive correlations among hepatic total magnesium (ionized Mg in hepatocytes), CAT activity and its gene mRNA were observed. **【Conclusion】** The results indicated that dietary Mg supplementation increasesd ionized Mg concentration in hepatocytes and promoted CAT gene expression, and consequently CAT activity was enhanced.

Key words: magnesium; ionized Mg; catalase; gene expression; broiler chicken

* [收稿日期] 2007-10-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30371043); 郑州牧业工程高等专科学校博士基金项目(200602)

[作者简介] 刘永祥(1969—), 男, 山东成武人, 副教授, 博士, 主要从事单胃动物营养研究。E-mail: yxliu225@163.com

镁是畜禽所必需的矿物质元素之一,也是机体内多种生理和生化过程所必需的辅助因子。据近年来少量文献报道,大鼠采食镁缺乏的日粮会降低多种组织的过氧化氢酶(catalase,CAT)活性,提高组织的脂质过氧化水平^[1-2];Guo 等^[3]报道,日粮中添加镁可显著提高肉仔鸡肝脏等组织中过氧化氢酶活性、降低脂质过氧化水平;在体外试验中,培养液镁缺乏会抑制鸡胚肝细胞中 CAT 活性,提高过氧化氢产量,诱导氧化应激损伤的发生^[4]。但迄今尚不了解镁调节肉仔鸡肝脏中 CAT 活性的机理。

镁广泛参与各种基因的表达,因此推测日粮镁可能通过增强肉仔鸡肝脏中 CAT 基因的表达,从而提高其活性。本试验旨在研究日粮镁对肉仔鸡肝脏 CAT 活性的影响,并对其基因表达进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 试验动物及日粮处理

将 128 只 AA 肉仔鸡随机均分到对照组和加镁日粮组,每组 8 个重复,每个重复 8 只鸡,对照组日粮为普通玉米—豆粕日粮,日粮的配制参考 NRC 标准(NRC,1994),日粮中镁含量实测值为 1.9 g/kg,在此基础上每 kg 日粮添加 10 g 天门冬氨酸镁(MgAsp)作为试验组日粮。MgAsp 购自安徽淮北生物制品厂,镁含量为 11.9%(产品标注)。日粮的组成及其营养水平如表 1 所示。肉仔鸡饲养在温控的饲养室直至 3 周龄。最初 3 d 的室温为 33~35 ℃,以后每周降低 3 ℃。自由采食,自由饮水,按常规程序免疫。

表 1 试验日粮的组成及其营养水平
Table 1 Experimental diet composition and nutrition levels

成分 Ingredient	对照组/(g·kg ⁻¹) Control	加镁日粮组/(g·kg ⁻¹) Mg supplementation	营养水平 Nutrition level	对照组 Control	加镁日粮组 Mg supplementation
玉米 Maize	554.7	551.7	代谢能/(MJ·kg ⁻¹) ME	12.71	12.71
大豆粕 Soyabean meal	360.0	360.0	粗蛋白/(g·kg ⁻¹) CP	220.7	220.7
大豆油 Soya oil	40.0	40.0	钙/(g·kg ⁻¹) Ca	10.0	10.0
磷酸氢钙 CaHPO ₃	18.0	18.0	有效磷/(g·kg ⁻¹) Available P	4.5	4.5
石粉 limestone	11.5	11.5	蛋氨酸/(g·kg ⁻¹) Met	5.0	5.0
蛋氨酸 DL-Methionine	2.0	2.0	赖氨酸/(g·kg ⁻¹) Lys	11.6	11.6
金霉素 Aureomycin(15%)	0.8	0.8	Mg/(g·kg ⁻¹)	1.90	3.10
氯化胆碱 Cholinechloride(50%)	1.0	1.0			
食盐 NaCl	3.0	3.0			
矿物质添加剂 Multi-vitamin premix	2.0	2.0			
维生素添加剂 Trace-minerals premix	0.2	0.2			
天门冬氨酸 L-Aspartic-acid	7.0				
天门冬氨酸镁 L-Aspartic-acid magnesium		10.0			

注:矿物质添加剂向每千克饲料提供 Cu 8 mg,Fe 80 mg,Mn 100 mg,Zn 75 mg,Se 0.15 mg,I 0.35 mg;维生素添加剂向每千克饲料提供维生素 A 12 500 IU,维生素 D₃ 2 500 IU,维生素 E 18.75 mg,维生素 K₃ 2.65 mg,维生素 B₁ 2.0 mg,维生素 B₆ 6.0 mg,维生素 B₁₂ 0.025 mg,叶酸 50 mg,D-泛酸钙 12 mg,尼克酸 1.25 mg。

Note: Trace-minerals premix provided per kg of diet: Cu 8 mg;Fe 80 mg,Mn 100 mg,Zn 75 mg,Se 0.15 mg,I 0.35 mg;Vitamin premix provided per kg of diet: Vitamin A 12 500 IU,Vitamin D₃ 2 500 IU,Vitamin E 18.75 mg,Vitamin K₃ 2.65 mg,Vitamin B₁ 2.0 mg,Vitamin B₆ 6.0 mg,Cobalamins 0.025 mg,niacin 5 0 mg,D-pantothenic acid 12 mg,folic acid 1.25 mg.

1.2 样品收集

饲养试验结束时,每个重复随机选择 1 只鸡,颈静脉放血处死,收集血液,于 4 ℃下,3 000 r/min 离心 15 min 分离血清;切除肝脏,部分用于肝细胞分

离,其余用液氮速冻后,于-80 ℃冻存,备用。

1.3 肉仔鸡血清镁质量浓度的测定

血清用 0.1 mol/L HCl 稀释,采用原子吸收法测定血清中镁质量浓度。

1.4 肉仔鸡肝细胞的分离

剪取 1 g 左右的肝组织,置于含有双抗的冷(4℃)RPMI1640 液中漂洗,去除血污并剥除被膜、脂肪、结缔组织和血管等纤维成分,剪成 1 mm³ 左右的小块后,倒入预先加有冷 RPMI1640 液的试管中反复洗 3 次,沉淀中加入 2.5 g/L 胰蛋白酶和 0.1 g/L EDTA 按等体积混合的消化液,37℃消化 10 min。悬液经孔径 0.074 mm 的不锈钢网过滤后加入胎牛血清,于 4℃冰箱中静置 20 min,此时多数上皮细胞沉于管底,而血细胞及碎片仍多浮于悬液中,弃悬液,加入 RPMI1640 培养液,以 800 g 离心 3~4 min,反复 3 次,用 1 g/L 台盼兰计算细胞活率。

1.5 肉仔鸡肝细胞内游离态镁的测定

利用 mag-indo-1 测定肝细胞内的游离态镁浓度。预先将 mag-indo-1 溶于荧光指示剂储存液 DMSO 中,浓度为 684 μmol/L。取细胞悬液 1 mL (细胞活力大于 95%),37℃预孵育 10 min,加入荧光指示剂,至终浓度 5 μmol/L,37℃恒温振荡 45 min,然后用细胞孵育液洗涤细胞 3 次。荧光分光光度计测定条件:游离态激发波长 349 nm,结合态激发波长 330 nm,发射波长 417~490 nm。校正方法:用洋地黄皂苷 25 μg/mL,或 EGTA,浓度高于镁离子浓度 2~3 倍。肝细胞内游离态镁浓度按下式计算:

$[Mg^{2+}]i=QK_d(R-R_{min})/(R_{max}-R),$

式中: R 为荧光强度比($F_{\lambda 1}/F_{\lambda 2}$), $\lambda 1$ 和 $\lambda 2$ 分别为用于测定结合态和离子态镁的波长; Q 对应 mag-indo-1 在镁被饱和吸收及完全解离子 2 种状态下的荧光强度比; K_d 为 mag-indo-1 和 Mg^{2+} 的解离常数; R_{min} 和 R_{max} 分别为 mag-indo-1 在镁被饱和及完全解离子 2 种状态下荧光强度比的最小值和最大值。

1.6 肉仔鸡肝细胞内总镁浓度的测定

将细胞悬浮 800 g 离心 5 min,沉淀细胞,细胞经冷冻干燥后于 550℃高温下充分灰化 24 h,然后加入适量 1.0 mol/L HCl 充分溶解,原子吸收法测定其中的镁含量,细胞灰化之前测定其中的蛋白含量,细胞内总镁含量表示为“nmol/mg 蛋白”。

表 2 日粮中添加 MgAsp 对 3 周龄肉仔鸡日增重、日采食量和料肉比的影响

Table 2 Effects of dietary MgAsp supplementation on average daily gain,average daily feed intake,the feed conversion efficiency of 3-weeks-old chickens

分组 Group	日增重/g Average daily gain	日采食量/g Average daily feed intake	料肉比 Feed conversion efficiency (F/G)
对照组 Control	30.36±1.13	41.65±2.47	1.37±0.04
加镁日粮组 Mg supplementation	30.24±1.08	41.53±2.35	1.37±0.04

1.7 肉仔鸡肝脏丙二醛(MDA)含量和 CAT 活性的测定

采用商业化试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)测定肉仔鸡肝脏中 MDA 含量和 CAT 活性。

1.8 肉仔鸡总 RNA 的抽提、反转录和实时荧光 PCR

用 TRIZOL 一步法抽提肉仔鸡肝脏总 RNA。取 2 μL 纯化的 RNA(约 2 μg)加入反转录体系中:1.25 μL M-MLV RT 反转录酶(200 U) (Introvgen Company),1 μL 的 Oligo dT18 (30 mmol/L),13 μL 无 RNA 酶的双蒸水,1.25 μL 10 mmol/L dNTP,1 μL RNA 酶抑制剂(50 U/μL);37℃保温 60 min,70℃15 min 灭活反转录酶。合成的 cDNA 于-20℃冻存。CAT 基因引物序列为:上游引物 5'-TAC GGT TCT CCA CTG TTG CTG-3',下游引物 5'-TGG ATG AAG GAT GGA AAC AAC-3'。以持家基因 β-actin 作为参比,其引物序列为:上游引物 5'-CTT CCG CCT TAA AAA CAA AAC ACA-3',下游引物 5'-CCC CCT CCC TCC CCC ACA TA-3'。PCR 反应体系为:1 μL cDNA,上、下游引物(0.25 μmol/L)各 0.6 μL,5.3 μL 双蒸水(无 RNA 酶),7.5 μL SYBR Green PCR master Mix (ABI Company),反应总体积为 15 μL。扩增条件为:55℃2 min,94℃预变性 10 min;94℃变性 15 s,53.5℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,40 个循环。每样品设 3 个重复。

1.9 统计分析

试验数据表示为“平均数±SD”,采用 SPSS11.5 统计分析软件进行 t 检验和相关分析。

2 结果与分析

2.1 日粮中添加 MgAsp 对肉仔鸡日增重、日采食量和料肉比的影响

由表 2 可以看出,加镁日粮组与对照组肉仔鸡的日增重、日采食量、料肉比均无显著差异($P>0.05$),说明本研究中 MgAsp 的添加量未超过肉仔鸡的耐受水平。

2.2 日粮中添加 MgAsp 对肉仔鸡血清镁、肝细胞总镁和游离态镁的影响

血清镁质量浓度提高了 15.7%($P<0.01$),肝细胞总镁和肝细胞内游离态镁浓度分别提高了 23.8%($P<0.01$)和 19.4%($P<0.01$)。

如表 3 所示,与对照组相比,加镁日粮组肉仔鸡

表 3 日粮中添加 MgAsp 对 3 周龄肉仔鸡血清镁、肝细胞总镁和游离态镁的影响

Table 3 Effects of dietary MgAsp supplementation on serum Mg concentration, total Mg concentration and ionized Mg concentration in hepatocytes of 3-weeks-old chickens

分组 Group	血清镁/(mg · L ⁻¹) Serum Mg	肝细胞总镁/(nmol · mg ⁻¹) Total Mg in hepatocytes	肝细胞内游离态镁/(mmol · L ⁻¹) ionized Mg in hepatocytes
对照组 Control	21.46 ± 1.62 A	60.08 ± 6.94 A	0.36 ± 0.02 A
加镁日粮组 Mg supplementation	24.85 ± 1.24 B	74.42 ± 4.46 B	0.43 ± 0.02 B

注:同列数据后不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。下表同。
Note: Different capital superscripts within a row mean very significant difference ($P<0.01$). The following table is the same.

2.3 日粮中添加 MgAsp 对肉仔鸡肝脏 MDA 含量、CAT 活性及其 mRNA 丰度的影响

鸡肝脏 CAT 活性及其 mRNA 丰度分别提高了 14.3%和 21.4%($P<0.01$),肝脏 MDA 含量降低了 14.6%($P<0.05$)。

如表 4 所示,与对照组相比,加镁日粮组肉仔

表 4 日粮中添加 MgAsp 对 3 周龄肉仔鸡肝脏丙二醛含量、过氧化氢酶活性及其 mRNA 丰度的影响

Table 4 Effects of dietary MgAsp supplementation on MDA content, CAT activities and its gene mRNA level in the liver of 3-weeks-old chickens

分组 Group	MDA/(nmol · mg ⁻¹)	CAT/(U · mg ⁻¹)	CAT 基因 mRNA Catalase gene mRNA
对照组 Control	0.48±0.06 b	128.90±2.98 B	0.11±0.021 B
加镁日粮组 Mg supplementation	0.41±0.05 a	147.38±10.45 A	0.136±0.023 A

注:CAT 基因 mRNA 丰度为相对值;同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Note: Abundance of catalase gene mRNA is relative; Different small letter within a row means very significant difference ($P<0.05$).

2.4 肉仔鸡肝细胞总镁(游离态镁)与肝脏 CAT 活性及其基因表达的相关分析

态镁与 CAT 活性、CAT 基因 mRNA 丰度间均存在显著正相关关系($P<0.05$)。

如表 5 所示,肉仔鸡肝细胞总镁、肝细胞内游离

表 5 肉仔鸡肝细胞总镁(游离态镁)、过氧化氢酶活性、过氧化氢酶基因 mRNA 丰度间的相关性

Table 5 Correlations among total Mg (ionized Mg), hepatic CAT activity and CAT mRNA level

指标 Index	CAT 基因 mRNA CAT mRNA	CAT 活性 CAT activity
CAT 基因 mRNA CAT mRNA		0.62*
CAT 活性 CAT activity	0.62*	
肝细胞总镁 Total Mg in hepatocytes	0.66*	0.59*
肝细胞游离态镁 Ionized Mg in hepatocytes	0.75*	0.64*

注: * 表示显著相关($P<0.05$)。
Note: * expresses correlation ($P<0.05$).

3 讨 论

3.1 日粮镁对血清镁和肝细胞内镁浓度的影响

血清镁是反映机体镁营养状况最有效的指标之一。生长鼠摄取镁缺乏的日粮,其血清镁含量会在数天内大幅度下降^[1-2]。家禽血清镁质量浓度对日粮镁含量呈高度依赖性,日粮中添加镁可提高血浆中的镁浓度^[5]。在本试验中,日粮镁极显著影响肉仔鸡血清镁质量浓度,说明肉仔鸡的镁营养状态显著受日粮镁的影响。

肝脏中镁含量受动物机体的调控^[6],对于鼠类动物,日粮中镁含量在相当大范围内不影响鼠肝脏、心脏等软组织中镁的沉积量^[6-7]。在本试验中,日粮中添加镁能极显著提高肝细胞总镁和游离态镁浓度;张桂梅^[8]的试验结果也表明,肉仔鸡肝脏镁对日粮镁有依赖性。禽类与鼠类试验结果的差异,可能是缘于动物生理特性的不同。

3.2 日粮镁对肝脏 CAT 基因表达的影响

以前的研究发现,日粮中添加氧化镁或镁蛋白盐能显著提高肉仔鸡肝脏中 CAT 和超氧化物歧化

酶活性,降低肝脏和腿肌中 MDA 含量^[3,8]。本试验结果为日粮中添加镁可以增强肉仔鸡肝脏 CAT 活性和降低脂质过氧化水平提供了新的证据。

在本试验中,肉仔鸡肝细胞总镁、CAT 活性及其基因表达之间呈显著正相关,因此日粮镁调节肝脏 CAT 活性的途径可能是:日粮中添加镁提高了肉仔鸡肝细胞的镁浓度,从而增强了 CAT 基因的表达,提高了 CAT 的活性。

在肝细胞内,90%的镁是结合态,只有 10%的镁是游离态的,但只有游离态的镁才有生理活性,而且机体内总镁和游离态镁浓度的变化并不是平行的^[9]。因此,为了进一步分析肝脏内镁和 CAT 活性的关系,本研究利用荧光极化技术检测了肝细胞内生理活性镁即游离态镁的浓度,结果表明日粮中添加镁显著提高了肝细胞内游离态镁浓度,而且游离态镁浓度与 CAT 活性表现显著正相关,进一步表明镁可能增强了 CAT 基因的表达,从而提高了 CAT 的活性。

3.3 日粮镁对调节肝脏 CAT 活性的其他途径

镁是多种酶活性的激活因子,在体内外对多种酶有激活作用^[10],镁是否对 CAT 有直接的激活作用,尚需进一步试验验证。此外,铁作为 CAT 活性中心离子对 CAT 活性无疑是重要的,例如在鸡胚胎发育过程中,伴随铁从蛋黄转移至肝脏,肝脏内 CAT 活性提高^[11]。镁和铁在肠道吸收和体内代谢过程中可能存在互作,日粮中添加镁会减少肠道对铁的吸收^[12],日粮中镁缺乏则会提高肝脏铁的含量^[13],日粮镁是否影响肝脏中的铁含量,从而影响 CAT 活性,尚需进一步研究。

4 结 论

日粮中添加镁提高了肉仔鸡肝细胞中总镁和游离态镁浓度,提高的镁浓度可能通过增强 CAT 基因表达而提高 CAT 活性。

[参考文献]

[1] Shivakumar K,Kumar B P. Mg deficiency enhances oxidative

stress and collagen synthesis in vivo in the aorta of rat [J]. Int J Biochem Cell Biol,1997,29:1273-1279.

[2] Andrzej K,Piotr K,Boleslaw F,et al. The changes in the antioxidant status of heart during experimental hypomagnesemia in balb/c mice [J]. Biometals,2001,14:127-133.

[3] Guo Y M,Zhang G M,Yuan J M,et al. Effects of source and level of Mg and vitamin E on prevention of hepatic peroxidation and oxidative deterioration of broiler meat [J]. Anim Feed Sci Tech,2003,107:143-150.

[4] Yang Y,Wu Z L,Chen Y,et al. Mg deficiency enhances hydrogen peroxide production and oxidative damage in chick embryo hepatocyte *in vitro* [J]. Biometals,2005,18:26-36.

[5] Gardiner E E,Rogler J C,Parker H E. Magnesium requirement of the chick [J]. Poult Sci,1959,46:1111-1115.

[6] Flatman P W. Mechanisms of magnesium transport [J]. Ann Rev Physi,1991,53:259-271.

[7] Zimmermann P,Weiss U,Classen H G,et al. The impact of diets with different Mg contents on Mg and calcium in serum and tissues of the rat [J]. Life Sci,2000,67:949-958.

[8] 张桂梅. 有机镁和无机镁对肉仔鸡的营养作用研究 [D]. 北京: 中国农业大学,2001.

Zhang G M. Nutritional effects of organic and inorganic magnesium on broiler chicks [D]. Beijing:China Agricultural University,2001. (in Chinese)

[9] Altura B T,Wilimzing C,Trnovec T,et al. Comparative effectiveness of Mg-enriched diet and different orally administered magnesium oxide preparations on ionized Mg metabolism and electrolytes in serum of human volunteers [J]. J Am Coll Nutr,1994,13:447-454. (in Chinese)

[10] Sun G,Raymond J A B. Requirement for an additional divalent metal cation to activate protein tyrosine kinases [J]. Biochemistry,1997,36:2139-2146.

[11] Sandrock B C,Kern S R,Bryan S E. The movement of zinc and copper from the fertilized egg into metallothionein-like proteins in developing chick hepatic tissue [J]. Bio Trac Elem Res,1983,5:503-515.

[12] Sanchez-Morito N,Planells E,Aranda P. Influence of Mg deficiency on the bioavailability and tissue distribution of iron in the rat [J]. J Nutr Biochem,2000,11:103-108.

[13] Vormann J T,Gunther V H,Schumann K. Effect of various degrees and duration of Mg deficiency on lipid peroxidation and mineral metabolism in rats [J]. J Nutr Biochem,1995,6:681-688.